Opracowanie wydajnej metody regeneracji roślin *Aralia spinosa* L. z zastosowaniem somatycznej embriogenezy w kulturze *in vitro*, ocena zmienności somaklonalnej regenerantów oraz profilu fitochemicznego uzyskanego materiału roślinnego

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

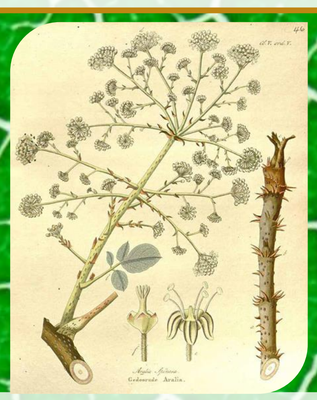
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Rafał Marcin Kiełkiewicz

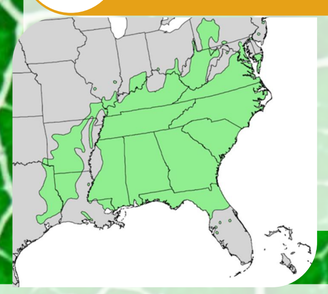
Promot pracy: dr n. farm. Anita Śliwińska

Praca magisterska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej

1 Wstęp



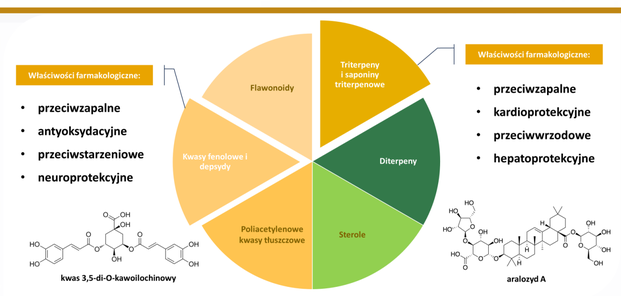
Ryc. 1. Budowa morfologiczna *A. spinosa* [8]



Ryc. 2. Zasięg naturalnego występowania *A. spinosa* w Ameryce Północnej [9]

Aralia spinosa **L. (Araliaceae) to krzew lub małe drzewo dorastające do 2–8 m wysokości (Ryc. 1) [1]. Naturalnie rośnie we wschodnich Stanach Zjednoczonych (Ryc. 2) [2]. Za biologiczne działanie roślin z rodzaju *Aralia* odpowiadają trzy główne grupy metabolitów wtórnych: triterpenoidy i saponiny triterpenoidowe, sterole i diterpenoidy. Cenną grupą są także kwasy fenolowe oraz ich glikozydy i depsydy (Ryc. 3) [3, 4]. Wśród nich wykazano znaczny potencjał przeciwstarzeniowy kwasu oleanolowego i związków fenolowych oraz właściwości adaptogenne i przeciwzapalne aralozydu A [3]. *A. spinosa* zaliczana jest do roślin leczniczych, jednak dotychczas była stosowana wyłącznie w medycynie tradycyjnej. *A. spinosa* była używana przez rdzennych mieszkańców Ameryki Północnej jako środek tonizujący, a także do leczenia blizn, kolki, wzdęć, reumatyzmu, paraliżu i bólu zębów [5]. Łodygi i kora *A. spinosa* stosowano jako składnik leku w leczeniu nowotworów skóry [6].**

Alternatywą do pozyskiwania metabolitów wtórnych pochodzenia roślinnego są kultury *in vitro*, które umożliwiają pozyskiwanie biomasy bez ingerencji w środowisko naturalne oraz zapewniające kontrolowane warunki wzrostu biomasy i czystość mikrobiologiczną ważną pod względem GMP. Somatyczna embriogeneza jest wydajną metodą umożliwiającą pozyskiwanie bardzo dużej ilości materiału roślinnego niezależnie od pór roku oraz jednorodnego genetycznie [7].



Ryc. 3. Główne grupy metabolitów wtórnych o potencjale farmakologicznym w rodzaju *Aralia*

2 Cele pracy

- **zapoczątkowanie i utrzymanie ciągłej hodowli *in vitro* różnorodnego materiału roślinnego *Aralia spinosa*, która obejmowała kultury: kalusa, zarodków somatycznych oraz roślin,**
- **opracowanie wydajnej metody regeneracji *A. spinosa* na drodze pierwotnej pośredniej somatycznej embriogenezy (PPSE) oraz wtórnej bezpośredniej somatycznej embriogenezy (WBSE),**
- **ocena zmienności somaklonalnej regenerantów *A. spinosa* uzyskanych za pomocą mikrorozmnażania z zastosowaniem technik molekularnych: SCoT oraz ISSR,**
- **fitochemiczna analiza jakościowa ekstraktów metanolowych z różnych eksplantatów *A. spinosa* z wykorzystaniem UHPLC-DAD-ESI-MS³ w celu określenia związków biologicznie czynnych biosyntetyzowanych przez jej organy.**

3 Materiały i metody

Etap I – Somatyczna embriogeneza

Do zainicjowania hodowli *in vitro* zastosowano stratyfikowane i sterylizowane nasiona *A. spinosa* (Fot. 1A). W celu opracowania wydajnej metody regeneracji na drodze somatycznej embriogenezy zbadano wpływ regulatorów wzrostu na indukcję kalusa. Liście pobrano z 8-tygodniowych sadzonek (Fot. 1C) i wykorzystano do zapoczątkowania hodowli *in vitro* kalusa nieembriogennego i embriogennego.

Do otrzymania kalusa wykorzystano pożywkę Murashige et Skoog (MS, 1962) [10] z kwasem 2,4-dichlorofenoksy-octowym (2,4-D; 0,125 – 2 mg/L). W celu indukcji zarodków somatycznych na drodze PPSE zastosowano następujące regulatory wzrostu: kwas indolo-3-masłowy (IBA; 1,0 - 4,0 mg/L) i 6-benzyloaminopurynę (BAP; 0,2 - 1,0 mg/L). Zarodki przeszły konwersję w rośliny na podłożu MS/3 (o zmniejszonym do 1/3 stężeniu makro- i mikroelementów oraz sacharozy) z dodatkiem węgla aktywnego (5 g/l), natomiast rośliny hodowano na pożywce Woody Plant Medium (WPM, Lloyd and McCown, 1980) [11]. BWSE przeprowadzono na zarodkach pierwotnych z zastosowaniem stresu osmotycznego (pożywka MS z dodatkiem sacharozy 50, 70 lub 100 g/l).

Aklimatyzacja roślin przebiegała w fitotronie oraz w pokoju hodowlanym z zastosowaniem uprawy hydroponicznej lub tradycyjnej uprawy w glebie. Kulturę *A. spinosa* prowadzono w pokoju hodowlanym, w temperaturze 24 ± 2°C, przy wilgotności 70 – 80%, oświetleniu 12 godzin na dobę i intensywności oświetlenia 40 µmol $m^{-2}s^{-1}$ lub w ciemności.

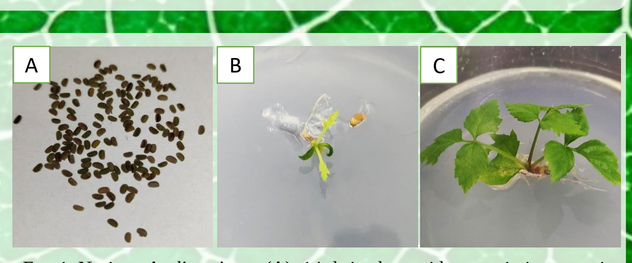
Etap II – Badania genetyczne

Badania jednorodności genetycznej wykonano dla rośliny macierzystej oraz 3 grup regenerantów z zastosowaniem 10 markerów SCoT oraz 10 markerów ISSR poprzez przeprowadzenie reakcji PCR i elektroforetycznego rozdziału produktów w żelu agarozowym w celu określenia zmienności somaklonalnej. Dla każdego markera dobrano warunki prowadzenia reakcji PCR.

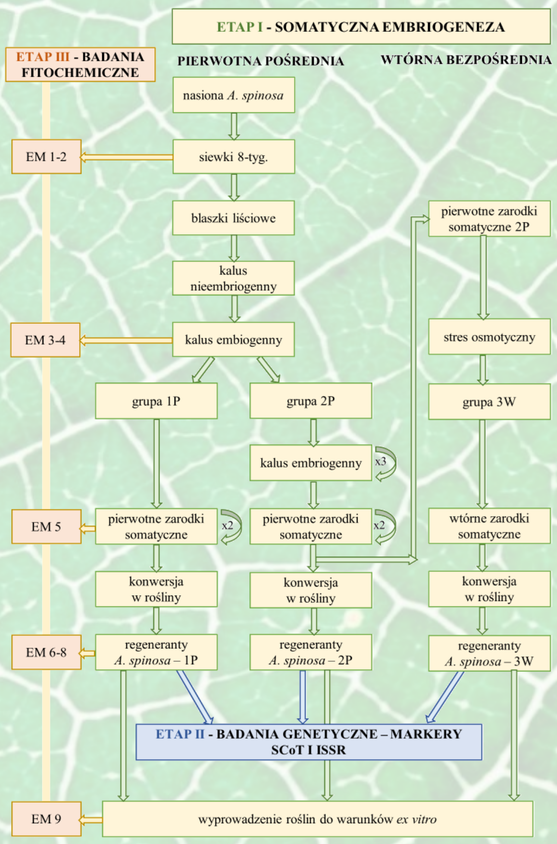
Etap III – Badania fitochemiczne

Profil fitochemiczny metabolitów wtórnych występujących w organach *A. spinosa* jest słabo poznany. Z tego powodu wykonano ekstrakty metanolowe z uzyskanego różnorodnego materiału roślinnego, które poddano następnie jakościowej ocenie fitochemicznej z zastosowaniem UHPLC-DAD-ESI-MS³.

Całościowy przebieg części eksperymentalnej niniejszej pracy zebrano graficznie na schemacie (Ryc. 4).



Fot. 1. Nasiona *Aralia spinosa* (A); 14-d siewka z widocznymi pierwszymi liściami właściwymi po przeniesieniu na pożywkę WPM bez regulatorów wzrostu (B); Roślina po 8 tygodniach kultury na pożywce WPM bez regulatorów wzrostu (C)

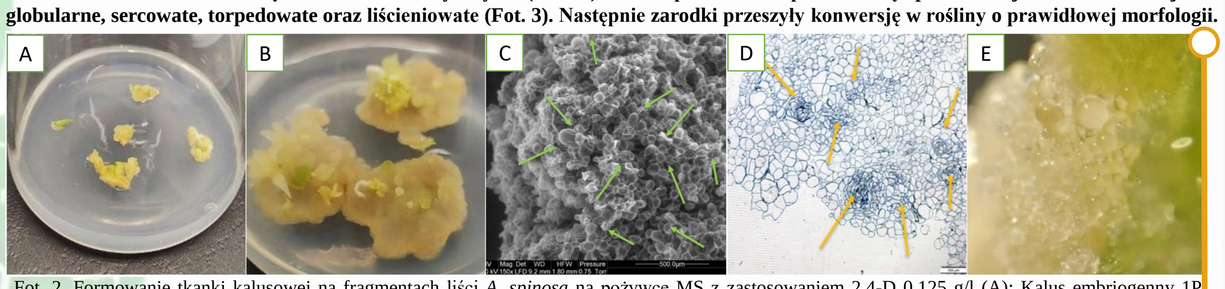


Ryc. 4. Schemat przebiegu części eksperymentalnej pracy. EM – ekstrakty metanolowe, P – pierwotna SE, W – wtórna SE, x2 - 2 pasaże 4-tyg., x3 – 3 pasaże 4-tyg.

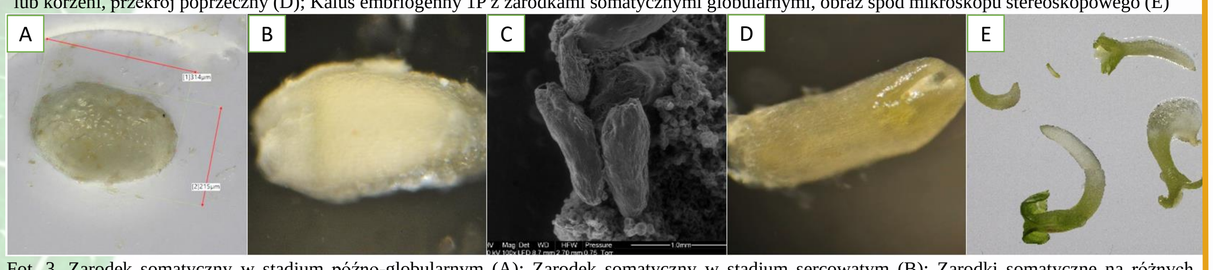
4.1 Wyniki

Etap I - Somatyczna embriogeneza *A. spinosa*

W niniejszej pracy po raz pierwszy opracowano wydajną metodę hodowli *A. spinosa* w kulturach *in vitro*. W warunkach naturalnych nasiona *A. spinosa* kiełkują w około 1%, natomiast stosując uprawę metodami biotechnologicznymi udało się podnieść ten odsetek 9-krotnie. Najwyższą efektywność tworzenia kalusa na fragmentach blaszek liściowych zaobserwowano przy stężeniu 2,4-D 0,25 mg/l, który wyniósł 93,33 ± 10,33%. Natomiast najwyższy (ponad 6-krotny w ciągu 30 dni) przyrost biomasy kalusa embriogennego zaobserwowano dla stężenia 2,4-D 0,125 mg/l. Po przeniesieniu z różnych modyfikacji pożywki indukcyjnej MS z 2,4-D na 7 modyfikacji pożywki MS z IBA lub IBA i BAP (Tab. 1) zaobserwowano tworzenie się zarodków somatycznych (Fot. 2), które prawidłowo przechodziły przez kolejne stadia rozwojowe: globularne, sercowate, torpedowate oraz liścieniowate (Fot. 3). Następnie zarodki przeszły konwersję w rośliny o prawidłowej morfologii.

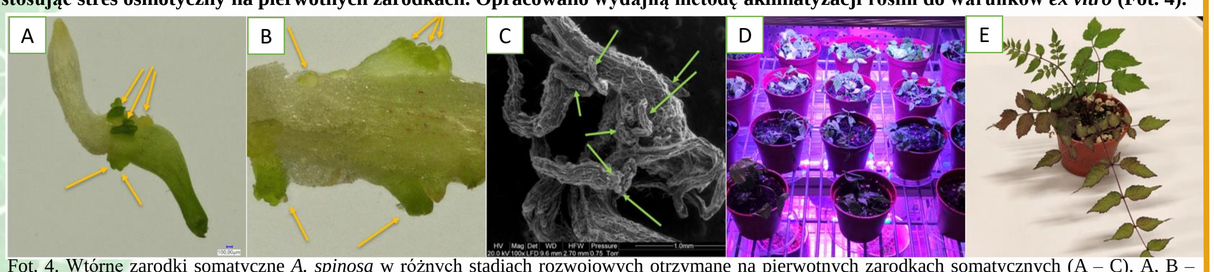


Fot. 2. Formowanie tkanki kalusowej na fragmentach liści *A. spinosa* na pożywce MS z zastosowaniem 2,4-D 0,125 g/l (A); Kalus embriogenny 1P uzyskany na pożywce MS z dodatkiem IBA 3,0 mg/l oraz BAP 0,5 mg/l po 4 tyg. kultury z widocznymi zarodkami oraz korzeniami (B); Kalus embriogenny z tworzącymi się licznymi zarodkami globularnymi, obraz SEM (C); Kalus embriogenny z licznymi centrami merystematycznymi pędów lub korzeni, przekrój poprzeczny (D); Kalus embriogenny 1P z zarodkami somatycznymi globularnymi, obraz spod mikroskopu stereoskopowego (E)

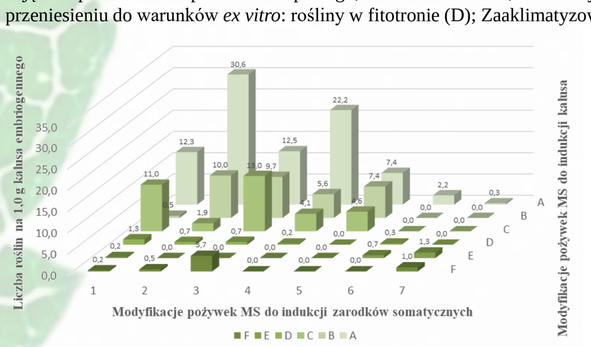


Fot. 3. Zarodek somatyczny w stadium późno-globularnym (A); Zarodek somatyczny w stadium sercowatym (B); Zarodki somatyczne na różnych etapach rozwoju w stadium torpedowatym, obraz SEM (C); Zarodek somatyczny w stadium późno-torpedowatym (D); Zarodki somatyczne na różnych etapach rozwoju w stadium liścieniowatym (E)

W niniejszej pracy po raz pierwszy opracowano metodykę uzyskiwania wtórnych zarodków somatycznych na drodze WBSE stosując stres osmotyczny na pierwotnych zarodkach. Opracowano wydajną metodę aklimatyzacji roślin do warunków *ex vitro* (Fot. 4).

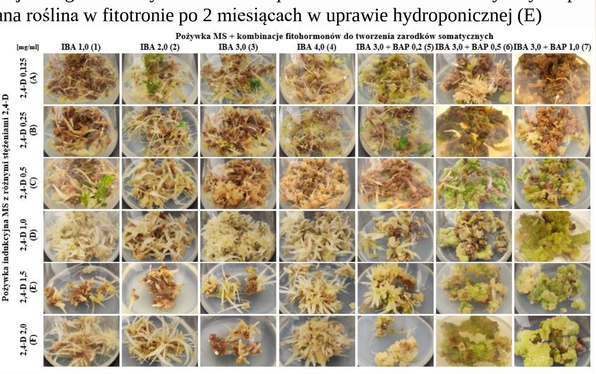


Fot. 4. Wtórne zarodki somatyczne *A. spinosa* w różnych stadiach rozwojowych otrzymane na pierwotnych zarodkach somatycznych (A – C). A, B – zdjęcia spod mikroskopu stereoskopowego; C – obraz SEM; Aklimatyzacja zregenerowanych roślin *A. spinosa* z zarodków somatycznych po przeniesieniu do warunków *ex vitro*: rośliny w fitotronie (D); Zaaklimatyzowana roślina w fitotronie po 2 miesiącach w uprawie hydroponicznej (E)



Ryc. 5. Liczba regenerantów *A. spinosa* w przeliczeniu na 1,0 g embriogennego kalusa 1P po 60 dniach kultury

modyfikacje MS z 2,4-D w zakresie stężeń 0,125 – 2,0 mg/l w pożywce do indukcji kalusa A – F; modyfikacje MS z IBA w zakresie stężeń 1,0 – 4,0 mg/l oraz BAP 0,2 – 1,0 mg/l w pożywce do indukcji zarodków 1 – 7

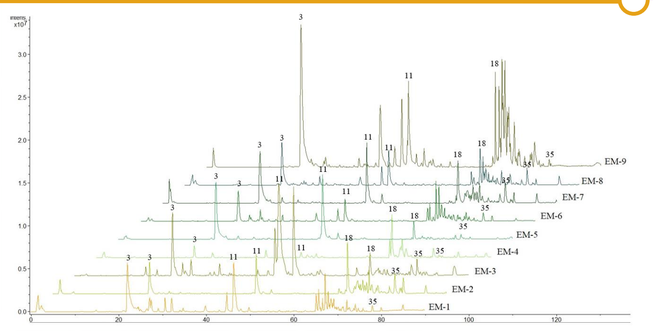


Tab. 1. Zróżnicowanie odpowiedzi kalusa embriogennego 1P *A. spinosa* po przeniesieniu z różnych modyfikacji pożywki indukcyjnej MS z 2,4-D (A - F) na 7 modyfikacji pożywki MS z IBA lub IBA i BAP (1 - 7) po 60 dniach kultury w celu indukcji zarodków somatycznych (pasaż 2)

4.2 Wyniki

Etap III – Badania fitochemiczne

W niniejszej pracy dokonano fitochemicznej analizy jakościowej ekstraktów metanolowych z materiału roślinnego *A. spinosa* z wykorzystaniem UHPLC-DAD-ESI-MS³, w wyniku której zidentyfikowano łącznie 35 metabolitów wtórnych. Profil fitochemiczny uzyskanych 9 ekstraktów z: tkanek kalusowych - nieembriogennej i embriogennej, pędów, korzeni oraz całych roślin hodowanych *in vitro* i *ex vitro* był zróżnicowany pod kątem wykrytych metabolitów wyspecjalizowanych. Wśród potwierdzonych związków stwierdzono 18 kwasów fenolowych oraz 17 saponin triterpenowych. Dominującymi kwasami fenolowymi były: kwas chlorogenowy oraz kwas izochlorogenowy A. Należy podkreślić fakt, że w badanych ekstraktach zidentyfikowano saponiny o bardzo cennych właściwościach biologicznych takie jak: aralozyd A, kalendulozyd E, zingibrozyd R1 oraz elatozyd C.

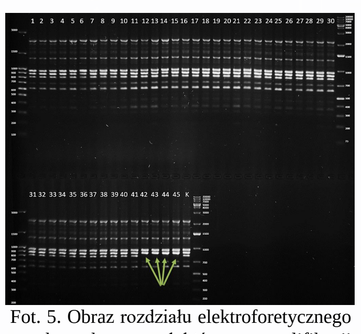


Ryc. 4. Chromatogramy UHPLC-DAD-ESI-MS³ ekstraktów metanolowych (e.)

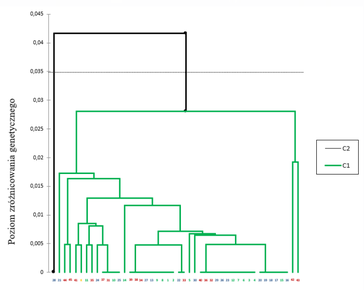
EM-1 – e. z pędów pobranych z 8-tyg. roślin otrzymanych z nasion, hodowanych na pożywce WPM; **EM-2** – e. z korzeni pobranych z 8-tyg. roślin otrzymanych z nasion, hodowanych na pożywce WPM; **EM-3** – e. z kalusa embriogennego uzyskanego na pożywce MS z dodatkiem 0,125 mg/l 2,4-D pasaż 3; **EM-4** – e. z kalusa embriogennego uzyskanego na pożywce MS z dodatkiem 1,0 mg/l 2,4-D pasaż 3; **EM-5** – e. z kalusa embriogennego z zarodkami somatycznymi hodowanym na pożywce MS wzbogaconej 2,0 mg/l IBA, po indukcji na pożywce MS z dodatkiem 0,125 mg/l 2,4-D pasaż 2; **EM-6** – e. z pędów pobranych z 12-tyg. regenerantów uzyskanych drogą somatycznej embriogenezy, hodowanych na pożywce WPM; **EM-7** – e. z korzeni pobranych z 12-tyg. regenerantów uzyskanych drogą somatycznej embriogenezy, hodowanych na pożywce WPM; **EM-8** – e. z całych roślin otrzymanych drogą somatycznej embriogenezy, hodowanych 12-tyg. na pożywce WPM; **EM-9** – e. z liści pobranych z regenerantów uzyskanych drogą somatycznej embriogenezy, po aklimatyzacji w fitotronie przez 8-tyg. w podłożu *ex vitro*.

Etap II – Badania genetyczne zmienności somaklonalnej

Metoda SCoT, umożliwiła identyfikację 125 markerów DNA, przy czym 122 produkty stanowiły prążki monomorficzne, natomiast prążki polimorficzne stanowiły zaledwie 2,40% (3 prążki, Fot. 5). Natomiast metoda ISSR umożliwiła identyfikację 88 markerów DNA, z czego 74 produkty stanowiły prążki monomorficzne, natomiast prążki polimorficzne stanowiły 15,91% (14 prążków). Analiza aglomeracji przeprowadzona metodą średnich połączeń (UPGMA) umożliwiła wyodrębnienie dwóch skupień (Ryc. 6). Pierwsze skupienie obejmowało jedynie jedną roślinę zregenerowaną na drodze WPSE - 2P28. W skład drugiego skupienia wchodziły wszystkie pozostałe regeneranty, a także roślina macierzysta (K). Uzyskane wyniki wskazują, że poziom zróżnicowania genetycznego pomiędzy rośliną macierzystą, a regeneratami 1P, 2P oraz 3W jest bardzo niski i wynosi jedynie 0,042 jednostek poziomu zróżnicowania genetycznego.



Fot. 5. Obraz rozdziału elektroforetycznego uzyskanych produktów amplifikacji z zastosowaniem wybranego startera SCoT-6; 1-15 – regeneranty z grupy **1P**, 16-30 – regeneranty z grupy **2P**, 31-45 – regeneranty z grupy **3W**, **K** – roślina macierzysta



Ryc. 5. Analiza skupień wykonana na podstawie markerów SCoT i ISSR dla regenerantów *A. spinosa* (1P), (2P), (3W) oraz rośliny macierzystej (K).

Dendrogram wykreślono przy użyciu współczynnika dystansu genetycznego Jaccard'a stosując metodę średnich połączeń (UPGMA). Istotność skupień (linia przerywana) określono na podstawie statystyki pseudo F przy poziomie istotności a = 0,05.

5 Wnioski

Zastosowanie kultur *in vitro* umożliwia na 9 krotne zwiększenie wydajności kiełkowania nasion *A. spinosa* w porównaniu do warunków naturalnych. Głównymi czynnikami zwiększającymi efektywność procesu kiełkowania jest zastosowanie fitohormonu – kwasu giberelinowego oraz skaryfikacja łupiny nasiennej.

Do indukcji kalusa nieembriogennego *A. spinosa* niezbędny jest dodatek niskiego stężenia do pożywki auksyny: 2,4-D oraz hodowla w ciemności.

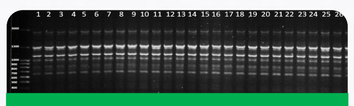
Do nabycia kompetencji do embriogeniczności konieczne jest przeniesienie kultury na światło.

Zwiększenie przyrostu kalusa embriogennego *A. spinosa* wymaga zastosowania niskiego stężenia 2,4-D (0,125 mg/l), co przyczynia się do osiągnięcia 6-krotnego przyrostu biomasy.

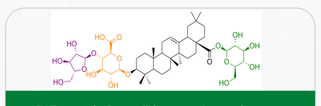
W celu indukcji tworzenia zarodków somatycznych *A. spinosa* na drodze PPSE z kalusa embriogennego niezbędne jest usunięcie 2,4-D oraz zastosowanie IBA. Do konwersji zarodków somatycznych w rośliny niezbędne jest obniżenie stężenia makro- i mikroelementów oraz sacharozy (do 1/3), usunięcie regulatorów wzrostu oraz dodatek do pożywki węgla aktywnego.

Efektywność tworzenia wtórnych zarodków somatycznych *A. spinosa* na drodze WBSE wymaga zastosowania wysokiego stężenia sacharozy 70 g/l. Pozwala to na uzyskanie 300 roślin z jednej kolby.

Rodzaj techniki aklimatyzacji wpływa na przeżywalność oraz szybkość wzrostu roślin *A. spinosa*. Uprawa hydroponiczna *ex vitro* w fitotronie przyczynia się do zwiększenia szybkości wzrostu i rozwoju roślin. Natomiast uprawa w ziemi w pokoju hodowlanym zwiększa procent przeżywalności roślin, a co za tym idzie wydajność aklimatyzacji roślin.



Opracowane warunki hodowli dla roślin *A. spinosa* zregenerowanych z zarodków somatycznych zarówno na drodze PPSE oraz WBSE nie indukują zmian na poziomie morfologicznym oraz genetycznym, co potwierdzono z zastosowaniem dwóch technik molekularnych: SCoT oraz ISSR. Uzyskany materiał może zostać wykorzystany jako jednorodny genetycznie materiał sadzeniowy.



Materiał roślinny *A. spinosa* hodowany *in vitro* i *ex vitro* jest zróżnicowany pod względem wytwarzania metabolitów wtórnych. W pędach najliczniejszą grupą były kwasy fenolowe, natomiast w korzeniach saponiny. W kalusie embriogennym ilość związków zaliczanych do obu tych grup występowały na podobnym poziomie.

Potwierdzenie obecności m. in.: aralozydu A, kalendulozydu E oraz elatozydu H w ekstraktach metanolowych, może wskazywać na wykorzystanie w przyszłości materiału roślinnego z *A. spinosa* jako źródło związków o potencjale: antyproliferacyjnym, przeciwzapalnym, przeciwwrzodowym, przeciwstarzeniowym, kardioprotekcyjnym oraz hipoglikemicznym.

6 Piśmiennictwo

[1] Wen J. Systematics of *Aralia* (Araliaceae). The Ohio State University; 1991. [2] Moore G, Glenn SD, Ma J. Distribution of the native *Aralia spinosa* and non-native *Aralia elata* (Araliaceae) in the Northeastern United States. Rhodora. 2009;111(946):145-54. [3] Clement JA, Clement ESH. The medicinal chemistry of genus *Aralia*. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2014;14(24):2783-801. [4] S. J. Sim J. E. Lee WJ, C. W. Choi, N. Kim, Y. Park, M. J. Kim, D. Lee and S. S. Hong. Diterpenoids and phenolic analogues from the roots of *Aralia continentalis*. Journal of Asian Natural Products Research. 2021;23(4):371-8. [5] Hamel PB, Chiltoskey MU: Cherokee plants and their uses : a 400 year history. In. Sylva, N.C.: Herald Pub. Co.; 1975. [6] Brussell DE. Araliaceae Species Used for Culinary and Medicinal Purposes in Niigata-Ken, Japan. Economic Botany. 2004;58(4):736-9. [7] Ma JK, Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R, Twyman RM. Plant-derived pharmaceuticals--the road forward. Trends Plant Sci. 2005;10(12):580-5; doi: 10.1016/j.tplants.2005.10.009. [8] plantsillustrations.org. Accessed 22.02.23. [9] https://www.usgs.gov/centers/geosciences-and-environmental-change-science-center. Accessed 22.02.23 [10] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1962;15(3):473-97. [11] Lloyd, G. and McCown, B.H. (1980) Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot-Tip Culture. Combined Proceedings International Plant Propagator's Society, 30, 421-427